

## II. RESPONSE TO THE OFFICE ACTION OF JANUARY 14, 2003

### A. The Status of the Claims

Claims 1, 2, 4-14, and 20 stand rejected and are currently pending.

Claims 1, 11, and 20 are amended herein.

Claims 21, 22, and 23 are added herein.

Claims 1, 2, 4-14, and 20-23 are currently pending.

### B. The Outstanding Rejection

Claims 1, 2, 4-14, and 20 stand rejected under 35 U.S.C. § 103(a) as allegedly unpatentable over Tang *et al.* in view of Branch and Monia *et al.* Applicant respectfully traverses the rejection. Even if one of ordinary skill in the art would be motivated to combine the cited references, the combined disclosures do not direct the skilled artisan to modify any *specific* antisense sequence that, when so modified, would inhibit expression of apolipoprotein B. Without guidance regarding specific regions in the target nucleic acid to which the antisense compound should be directed, the skilled worker is left to empirically determine which and *if* regions in the protein coding nucleic acid can be targeted *in vivo* to hybridize with an antisense compound and then *if* antisense hybridization with this region in the target nucleic acid will inhibit expression of the encoded protein. In other words, because the Tang *et al.* abstract fails to disclose the structure of any antisense compounds that *might* inhibit expression of apolipoprotein B, there are no antisense oligonucleotides to which the modification of Branch and Monia *et al.* can be applied. If, as the examiner asserts, the combined disclosures of the cited references motivate the worker of skill in the art to attempt to produce a compound or composition of the present invention, the empirical nature of the work prompted by the combined disclosures fails to provide the skilled worker art with any expectation of success. Accordingly, the cited references fail to render the claims obvious.

In Appendix A, Applicant includes the Tang *et al.* article that corresponds to the abstract cited by the Examiner. At the time of this filing, Applicant is in the process of translating the Chinese article into English. Applicant will submit the translation in a Supplemental IDS and provide a supplemental Response if necessary. Nonetheless, it appears that Tang *et al.* discloses an oligonucleotide 20 nucleotides in length that is complementary to the first 20 nucleotides of the ApoB open reading frame (*see p.*, 315, right

Application No.: 09/920,033

column). This oligonucleotide, however, does not anticipate or render obvious the subject matter of the present claims as amended herein.

Dated: May 14, 2003

Respectfully submitted,

By 

Thomas J. Wrona, Ph.D.

Registration No.: 44,410

MARSHALL, GERSTEIN & BORUN

233 S. Wacker Drive, Suite 6300

Sears Tower

Chicago, Illinois 60606-6357

(312) 474-6300

Attorneys for Applicant

## 反义寡脱氧核苷酸抑制大鼠肝细胞载脂蛋白 B 的表达

唐其东 林碧莲<sup>①</sup> 林曙光

(广东省心血管病研究所, 广州 510100)

**主题词** 反义寡脱氧核苷酸; 载脂蛋白 B; 聚合酶链反应; 细胞培养; 基因表达; 肝; 大鼠**摘要** 为探讨反义寡脱氧核苷酸对大鼠肝细胞载脂蛋白 B 基因的表达是否具有调控作用, 并探索其作用机制。以合成的载脂蛋白 B 基因正、反义寡脱氧核苷酸加入培养的肝细胞, 测量载脂蛋白 B100 含量; 用反转录聚合酶链反应评价载脂蛋白 B 基因的表达。结果发现, 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸可明显下调载脂蛋白 B100 的 mRNA 表达, 5、10、15 和 20  $\mu\text{mol/L}$  的反义寡脱氧核苷酸, 可分别降低肝细胞载脂蛋白 B 浓度的 26.6%、34.2%、34.2% 和 45.8%, 抑制效果呈剂量依赖性。此结果说明, 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸能抑制载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B100 水平, 其可能的作用机制是针对 mRNA 的合成, 进行转录和翻译水平上的阻断。

### The Inhibitory Effect of Antisense Oligodeoxynucleotides on Apolipoprotein B Expression in Liver Cells of Rat

TANG Qi-Dong, LIN Bi-Lian<sup>①</sup> and LIN Shu-Guang(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100; <sup>①</sup> Department of Pharmacy, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)**MeSH** Oligodeoxynucleotides, Antisense; Apolipoprotein B; Polymerase Chain Reaction; Cell Culture; Gene Expression; Cells, Liver; Rat**ABSTRACT** **Aim** To reduce the level of apolipoprotein B (Apo B) via the inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides (AODN) on expression of Apo B gene in cultured liver cells and search its mechanism. **Methods** The cultured liver cells were treated with synthesized Apo B gene antisense, sense ODN (SODN) and 0.9% salt solution respectively. Apo B100 concentration was measured by Auto-biochemical Instruction. The mRNA level was observed by using of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Apo B gene AODN 5, 10, 15, and 20  $\mu\text{mol/L}$  inhibited Apo B concentration 26.6%, 34.2%, 34.2%, and 45.8% respectively. The inhibitory effect appeared in a concentration-dependent manner. RT-PCR showed that Apo B gene AODN downregulated Apo B mRNA expression obviously. **Conclusions** The ApoB gene AODN inhibited Apo B gene expression obviously and reduced Apo B concentration. The possible mechanisms are to downregulate Apo B mRNA level and inhibit translation of Apo B gene.

流行病学调查和动物实验研究表明, 血浆载脂蛋白 B (apolipoprotein B) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 增高是动脉粥样硬化的高度危险因素<sup>[1]</sup>。LDL 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的主要构成蛋白是载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 B48, 两者是同一个载脂蛋白 B100 基因的不同表达产物。研究结果提示, 载脂蛋白 B100 基因对致动脉粥样硬化的脂蛋白 LDL 和 VLDL 有强烈的调节作用<sup>[2]</sup>。

近年来发展起来的寡脱氧核苷酸反义技术, 能特异性地封闭特定基因的表达而不影响其它基因<sup>[3]</sup>, 从而可以按需要抑制某些基因的表达, 影响其生物学功能。因此, 我们设想, 通过反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因表达的调控, 有可能治疗高胆

固醇血症和预防动脉粥样硬化的发生。

### 1 材料与方法

#### 1.1 载脂蛋白 B100 基因寡脱氧核苷酸的合成

以人载脂蛋白 B100 基因翻译起始区域 20 个碱基序列为模板, 用 DNA 合成仪 (Pharmacia), 合成载脂蛋白 B100 基因反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, AODN)、正义寡脱氧核苷酸 (sense oligodeoxynucleotide, SODN), 在合成过程中, 对碱基进行硫代磷酸化修饰。AODN 序列如下: 3' TACCTGGCGGCTCCGCGCG 5'; SODN 序列为: 5' ATG-GACDDCCCGAGGCCCGC 3'。用紫外分光光度计 (Japan Shimadzu) 进行浓度测定。

#### 1.2 细胞培养

SD 大鼠, 由中山医科大学实验动物中心提供。

① 中山大学生命科学学院药理学系, 广州 510275

主要试剂中 collagenase IV、EDTA、trypsin、葡聚糖、微载体 Cytodex 3、RPMI 1640 培养基为 Gibco 产品, CO<sub>2</sub> 培养箱及培养瓶皿分别为 Cellstar USA 和 Nunc 公司产品,其它试剂及物品购于华美生物工程公司。

以体外两步灌流法分离肝细胞,经台盼兰染色计数后,按浓度为  $4 \times 10^5/L$ ,将肝细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基内,加入微载体 Cytodex 3 (5 mg/L) 置 37℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度 100% 条件下培养。每 15~30 min 旋转振荡一次,至浮游的单个肝细胞明显减少为止,每 24 h 更换相同培养基一次。收集微载体培养肝细胞,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次,以 3% 戊二醛固定 4 h,1% 锇酸后固定 15 min,系列丙酮脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥后,真空喷镀,AMRAY 1000B 型扫描电镜下观察。

### 1.3 载脂蛋白 B100 含量检测

同一批次培养肝细胞,随机分成六组,每组 13 瓶,在 1.2 所述的条件下培养,但不更换培养基,分别加入生理盐水、SODN (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 AODN (20  $\mu\text{mol/L}$ 、15  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$ )。三天后,离心收集上清液,以全自动生物化学检测仪 (Beckman) 测量各组载脂蛋白 B100 含量;按如下公式计算抑制百分率:抑制百分率 = (空白对照组载脂蛋白 B100 的浓度 - 处理组载脂蛋白 B100 的浓度)  $\div$  空白对照组载脂蛋白 B100 的浓度  $\times 100\%$ 。收集肝细胞进行反转录聚合酶链反应检测。

### 1.4 反转录聚合酶链反应检测载脂蛋白 B 基因的表达

用 RNA 抽提试剂盒 (Pharmacia) 对  $5 \times 10^6$  肝细胞进行总 RNA 抽提,经反转录试剂盒 (Boehringer mannheim) 合成 cDNA,用 DNA 扩增仪,按照试剂盒提供的程序进行 cDNA 的聚合酶链反应扩增;扩增引物如下:载脂蛋白 B 引物 primer 1: 5' TGAGGT-TCTTCAGCCCTGCTT 3', primer 2: 5' TCACCCAGAAT-CATGCCCTG 3';  $\beta$ -actin 引物: 5' AAGGATTCCTAT-GTGGGC 3', 5' CATCTCTTGCTCGAAGTC 3';  $\beta$ -actin 扩增 35 个循环,载脂蛋白 B 扩增 36 个循环。扩增产物于含溴化乙锭的 2% 琼脂糖中电泳, Bio-Rad 1000 凝胶成像密度仪分析扩增结果。

### 1.5 统计学分析

所有资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 ANOVA 的  $t$  检验进行统计学差异分析,以  $P < 0.05$  作为有显著性差异的标准。

## 2 结果

### 2.1 扫描电镜观察结果

肝细胞呈半球形紧密贴附于圆球形微载体上,似“仙人球”样。粘附于微载体上的肝细胞数量多寡不一、分布不均,聚集成小团,散在分布。肝细胞之间亦存在紧密连接,并借此使微载体互相连接成团块状。

### 2.2 载脂蛋白 B 检测及统计结果

由表 1 (Table 1) 可见, SODN 组与空白对照组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而不同浓度的 AODN 均表达了对载脂蛋白 B100 的抑制作用,与空白对照组比较,浓度有显著性或非常显著性差异 ( $P < 0.05 \sim P < 0.001$ ),其抑制百分率分别为 45.8%、34.2%、34.2% 和 26.6%。

表 1. 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B100 浓度的影响

Table 1. Antisense Oligodeoxynucleotides of Apolipoprotein B gene effect on the concentration of of Apolipoprotein B100

Groups	Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Apolipoprotein B100 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Inhibitory rate (%)
Control		$0.4831 \pm 0.06$	
SODN	20	$0.4346 \pm 0.07^a$	
AODN	20	$0.2620 \pm 0.08^d$	45.8%
AODN	15	$0.3180 \pm 0.10^c$	34.2%
AODN	10	$0.3162 \pm 0.10^c$	34.2%
AODN	5	$0.3546 \pm 0.06^b$	26.6%

a:  $P > 0.05$ , b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , d:  $P < 0.001$ , compared with control group

### 2.3 载脂蛋白 B 基因 mRNA 表达检测结果

经 2% 琼脂糖电泳后,显示出扩增结果均为单一条带,与预测大小一致。随着反义寡脱氧核苷酸浓度的增大载脂蛋白 B 的表达逐渐降低,且其任何一道都明显低于空白对照组及 SODN 组 (图 1, Figure 1)。

## 3 讨论

血脂紊乱导致动脉壁内沉积过多胆固醇是造成动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的重要原因<sup>[4]</sup>。现已证实,血浆载脂蛋白 B、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及脂蛋白 (a) 增高是动脉粥样硬化的高度危险因素<sup>[1,8]</sup>,而 HDL 升高有利于抗动脉粥样硬化<sup>[5,8]</sup>。因而降低 LDL 和载脂蛋白 B 的水平有可能防治 As 及其并发症。载脂蛋白 B 是 LDL 和 VLDL 的主要载脂蛋白。正常载脂蛋白 B 是以载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 B48 两种形式存在,是同一载

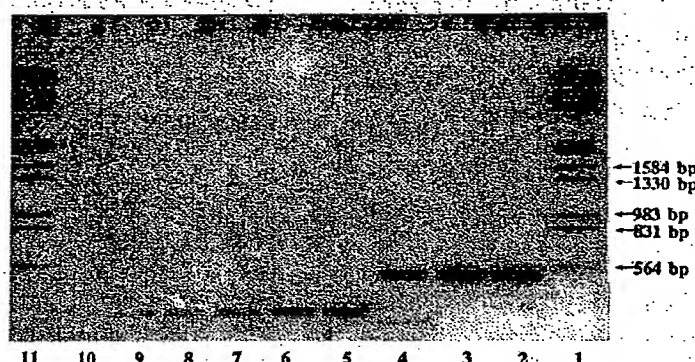


图 1: 不同处理后培养的大鼠肝细胞载脂蛋白 B 基因表达水平

Figure 1. The mRNA level of apolipoprotein B gene expression in cultured liver cells in different treated groups. Lane 1, and 11 were DNA Marker. Lanes 2, 3, and 4 were a 532 bp amplified product of  $\beta$ -actin gene in control group, sense treated group (20  $\mu$ mol/L), and antisense treated group (20  $\mu$ mol/L). Lane 5, and 6 were sense treated group (20  $\mu$ mol/L) and control group. Lane 7, 8, 9, and 10 were the amplified products of apolipoprotein B gene treated with antisense oligodeoxynucleotides in different concentration (5, 10, 15, and 20  $\mu$ mol/L), 415 bp.

脂蛋白 B 基因的翻译产物。载脂蛋白 B 基因的全长表达蛋白即载脂蛋白 B100, 在载脂蛋白 B 基因经历转录后的 C? U 转变, 使得密码在 CAA 处(谷氨酰胺, 2153)转变为终止密码子 UAA 后, 它就只能编码载脂蛋白 B48<sup>[6]</sup>。载脂蛋白 B48 是组成 VLDL 的主要载脂蛋白<sup>[6]</sup>, 也是脂蛋白(a)的主要蛋白<sup>[7]</sup>。而 LDL 亲水层中的蛋白质几乎均为载脂蛋白 B100<sup>[6]</sup>。因此, 可以推测, 如果载脂蛋白 B100 缺失, LDL 将失去 95% 的蛋白来源, 无法形成亲水层, 降低 LDL 水平, 有利于治疗和预防动脉粥样硬化。

有关报道指出, 一个载脂蛋白 B 等位基因发生突变或缺失, 常常导致无症状的家族性低(脂蛋白血症, 使血浆总胆固醇降低<sup>[3]</sup>)。这提示: 载脂蛋白 B 基因缺失或部分缺失(或叫功能失活或部分失活)可明显下调血脂水平。最近 Farese 研究报道, 通过插入干扰基因导致鼠载脂蛋白 B 基因表达缺失, 血浆载脂蛋白 B、胆固醇、VLDL、LDL 浓度降低 20% - 70%<sup>[2]</sup>。近年来的分子生物学方面的一重大进展是特异性抑制基因复制、转录、翻译的反义寡脱氧核苷酸的发现, A 寡脱氧核苷酸通过与双链 DNA 结合形成三链, 或与局部解链的 DNA 单链结合, 通过与相应的 mRNA 结合抑制 DNA 复制、转录和翻译, 达到失活基因的目的。因此, 在研究中, 我们通过 AODN 对载脂蛋白 B 基因的封闭, 下调载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B100 的浓度, 从而, 有可能防治动脉粥样硬化的发生。但抑制载脂蛋白 B100 表达导致 LDL 形成受阻, 其结果对体内血脂转运的影响, 此方面研究正待进行。

本研究证明载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷

酸在调节血脂方面具有潜在的临床应用价值, 反义寡脱氧核苷酸能明显抑制载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B 的浓度, 而且具有量效关系。但从实验抑制百分率来看, 效果不是很理想。实验中最大的抑制率只有 45.8%, 原因有三, 其一: 反义寡脱氧核苷酸是直接加在肝细胞群, 而它要发挥阻断基因表达作用, 必须进入细胞核。虽然寡脱氧核苷酸的分子量不高, 但在无任何载体包裹运输的情况下, 由于膜透过率、细胞摄取力、各种损失及其他未知的影响因素, 降低了真正到达细胞核内发生反应的反义寡脱氧核苷酸浓度; 其二: 从抑制率和剂量的相关性来看, 反义寡脱氧核苷酸浓度越高, 抑制率越高, 可见具有明显的剂量依赖性, 因而, 抑制率不理想也很有可能与反义寡脱氧核苷酸浓度不足有关; 其三: 从电泳结果发现, 反义寡脱氧核苷酸处理后,  $\beta$ -actin 表达相对于对照组有所下调, 是否我们的反义寡脱氧核苷酸序列的特异较低, 有待进一步研究。本次实验只是对反义寡脱氧核苷酸抑制载脂蛋白 B 基因表达有效性及可行性进行初步探讨, 而且合成寡脱氧核苷酸的原料及实验试剂十分昂贵, 无法实现大量分组, 造成实验结果的局限性。

本实验还初步探讨了反义基因的作用机制, 发现它能明显抑制 mRNA 的水平, 证明在转录水平上的抑制是反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因调控作用的一个机制。同时, 载脂蛋白 B100 浓度的明显降低也提示了 AODN 在翻译水平上抑制的可能性, 这需要进一步研究证实。虽然反义技术抑制基因表达的研究已相当普遍, 对于动脉粥样硬化的治疗方法研究探讨也十分广泛深入, 但通过反义寡脱

氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因表达的调控,降低载脂蛋白 B 含量和 LDL 水平,从基因水平上治疗高胆固醇血症和预防动脉粥样硬化的发生,国内外尚无报道。因而,这是一个很值得研究的空白领域。

#### 参考文献

1. Tada Y, Nakase M, Adachi J, et al. Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plant by antisense gene. *FEBS Lett*, 1996, 391: 341-345
2. Farese RV Jr, Chiesa G, Grass DS. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein (a). *J Clin Invest*, 1993, 6: 3 029-037
3. Skizky Yama, Pencock R, Demming A, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: A study of

young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. *J Mol Biol*, 1993, 213: 53-57

4. Reichl D. Extravascular circulation of lipoproteins: their role in reverse transport of cholesterol. *Atherosclerosis*, 1994, 105: 117-129
  5. 刘亚平. 94 例冠心病、93 例糖尿病患者血脂及载脂蛋白分析. *中日友好医院学报*, 1997, 11(3): 253-256
  6. 吕新跃. 载脂蛋白 B mRNA 编辑蛋白. *中国动脉硬化杂志*, 1996, 4(3): 221-225
  7. 冯学冠, 钱士匀, 邱辅佑, 等. 血脂正常的冠心病患者血清载脂蛋白 AI 和 B100 检测的临床意义. *现代诊断与治疗*, 1996, 7(4): 200-201
  8. 夏舜英, 蔡光明, 程玲. 不同类型冠心病与脂蛋白及载脂蛋白异常. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6(4): 329-332
- (此文 1999-07-02 收到, 1999-11-15 修回)  
(此文编辑 胡必利)

## 关于汉语文稿中名词术语使用英文缩写的规定

(中国动脉硬化杂志编辑部)

当一个多汉字的名词术语在汉语文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免赘词重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题:①同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;②名词术语的缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白 (apolipoprotein), 缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词(主题词),有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对汉语文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请作者遵照执行。

1. 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用中文;多于 3 个汉字的,可使用英文缩写;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用中文;但冠心病、肺心病等例外。
2. 文题、摘要和关键词(主题词)中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。
3. 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语;段首和句首的名词术语,也不得用缩写词来代替。
4. 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:汉字(英文,缩写)。如:极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等,以下行文,可只写缩写词,不必注释汉字。
5. 名词术语的英文缩写原则

5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语,缩写时一律取实词首字母,全大写;如总胆固醇 (total cholesterol, TC)。但相沿成习的写法例外,如氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。

5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时,不论主干词和前缀之间是否有连字符,一律取前缀和主干词的首字母,全大写,如去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)。

5.3 组合法构成的单词名词术语,其间若没有连字符,缩写时取首字母和另 1~2 个字母,首字母大写,余小写,如动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As),但相沿成习的写法例外,如动脉硬化 (arteriosclerosis, AS)、甘油三酯 (triglyceride, TC)、白细胞介素 (interleukin, IL) 等。

5.4 组合法构成的名词术语,其间有连字符的,按照上述第 5.1 条原则缩写。

5.5 用来代替汉字名词术语的英文缩写词,在汉语文稿中不用复数。

5.6 缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

6. 一篇文稿中的名词术语使用英语缩写词来代替,应严格限制数量,论著类(含实验研究、临床研究、研究简报、摘要、流行病学调查等)和技术方法类文稿每篇限 4 个内,其他文稿限 3 个内。

7. 书写、打字或排版时,名词术语的英文缩写词不移行。

以上规定,自 1994 年 10 月 1 日起生效;此后,凡文稿中有不符合规定者,本刊将退回作者重写,直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)